

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-082225

(43)Date of publication of application : 28.03.1995

(51)Int.Cl.

C07C233/47  
 A61K 31/195  
 A61K 38/00  
 C07C233/49  
 C07C233/56  
 C07C233/83  
 C07C237/22  
 C07K 5/072  
 C07K 5/093

(21)Application number : 05-228641

(71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD

(22)Date of filing : 14.09.1993

(72)Inventor : NISHIKAWA NAOYUKI

KOMAZAWA HIROYUKI

OKADA HISASHI

INABA TADASHI

SAIKI IKUO

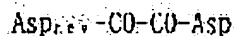
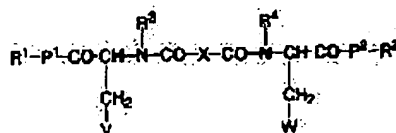
AZUMA ICHIRO

## (54) AMINO ACID DERIVATIVE AND ITS USE

## (57)Abstract:

**PURPOSE:** To provide a novel amino acid derivative exhibiting high cancer cell metastasis-inhibiting effect, a cell adhesion-inhibiting activity and a cell migration-inhibiting activity.

**CONSTITUTION:** An amino acid derivative of formula I [X is 1-3C alkylene, 4-8C cyclic alkylene, phenylene, or does not exist; V, W are COOH, -CONH<sub>2</sub>; P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> are OH, organic group; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> are OH, organic group; R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> are H, alkyl (the steric configurations of the asymmetric carbon atoms contained in the formula are either of R and S, respectively)], e.g. a compound of formula II. The compound of formula I is obtained e.g. by condensing two equivalents of aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine or their corresponding derivatives, the side chains and the carboxyl groups of the compounds being protected with suitable groups, with one equivalent of a corresponding dicarboxylic acid, and subsequently subjecting the reaction product to a protecting group-removing treatment, a purification treatment, a salt-removing treatment and a salt-forming treatment.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

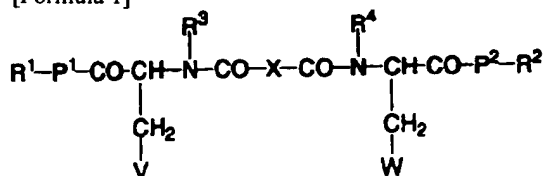
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

## CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The following, the amino acid derivative shown by the general formula (I), or its salt permitted in pharmacology. General formula (I)

[Formula 1]



Among the formula, X may show the straight chain of carbon numbers 1-3 or the alkylene machine of branching, the annular alkylene machine of carbon numbers 4-8, or a phenylene group, and may have the substituent and the unsaturation machine. Even if X exists, it is not necessary to carry out it. V and W show -COOH or -CONH<sub>2</sub>. even if V and W are mutually the same, they may differ P<sup>1</sup> and P<sup>2</sup> show an amino acid residue or a peptide residue. even if P<sup>1</sup> and P<sup>2</sup> are mutually the same, they may differ from each other, and even if they exist, it is not necessary to carry out them R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> show a hydroxyl group or an organic machine. even if R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> are mutually the same, they may differ R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> show a hydrogen atom or an alkyl group. even if R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> are mutually the same, they may differ About the configuration of the asymmetric carbon atom which exists in a formula, any of R, S, and RS are respectively sufficient.

[Claim 2] The compound according to claim 1 R<sup>3</sup> and whose R<sup>4</sup> R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> are hydroxyl groups, and are hydrogen atoms.

[Claim 3] The compound which comes to connect with a macromolecule or an organic molecule two or more amino acid derivatives shown by the general formula (I), or its salts which are permitted in pharmacology according to covalent bond.

[Claim 4] The cancer transition inhibitor which comes to contain a compound according to claim 1 to 3.

[Claim 5] The cell-adhesion inhibitor which comes to contain a compound according to claim 1 to 3.

[Claim 6] The cell-migration inhibitor which comes to contain a compound according to claim 1 to 3.

[Translation done.]

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

### [Detailed Description of the Invention]

[Industrial Application] this invention relates to the amino acid derivative in which high cancer transition depressor effect, cell-adhesion prevention activity, and cell-migration prevention activity are shown.

[Description of the Prior Art] A fibronectin and vitronectin are protein called a cell and matrix molecule outside a cell which participates in adhesion of an extracellular matrix. Recently, these interactions became clear [ being mediated by the receptor of a series of cell surface ]. And it is shown clearly that the Arg-Gly-Asp array in the cell-junction domain of a fibronectin is a recognition site (Nature (Nature), the 309th volume, 30 pages, 1984), and it is reported that it is VLA-5 receptor to which one of the cell receptor of the belongs to an integrin family. Furthermore, it is known that the Arg-Gly-Asp array exists in other adhesive protein, such as vitronectin.

Moreover, the matrix molecule outside a cell is joined to the receptor of a pasted up cell through the above-mentioned array, and it is said that the information is transmitted to an adhesion cell. Furthermore, it also has a binding affinity with biopolymers, such as a heparin, a collagen, and a fibrin, and it is thought that it is participating in adhesion with a cell and a stromata connective tissue, specialization of a cell, and proliferation.

[0003] On the other hand, it is expected that these matrix molecules outside a cell are participating also in adhesion of a cancer cell and control of isolation in the transition process of cancer. Then, the attempt which checks transition of a cancer cell using a peptide with the Arg-Gly-Asp array which is a recognition site is reported. For example, it was shown that Yamada and others suppresses the experimental transition to the lungs of the B16-F10 melanoma cell whose PENTA peptide (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) which is the adhesion signal of a fibronectin is a metastatic-carcinoma cell (a science (Science), the 233rd volume, 467 pages, 1986).

Furthermore, this array. The polypeptide which has the oligopeptide which it has, or its repeat structure is used. The method of suppressing cancer transition more efficiently is indicated (international journal OBU biological macroscopic leakage at bulb KYURUZU (Int.J.Biol.Macromol.)). The 11th volume, 23 pages, 1989, the same magazine, the 11th volume, and 226 A page, 1989, Japan Journal OBU Cancer Research (Jpn.J.Cancer Res.) The 60th volume and 722 A page, 1989, JP.2-174798.A.

[0004] However, the activity of these oligopeptides with an Arg-Gly-Asp array was left behind as a technical problem which it is not enough and should be solved.

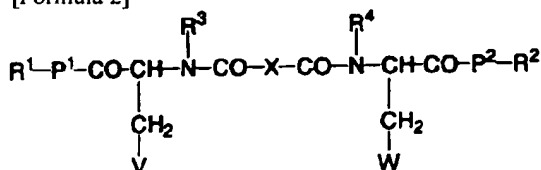
[0005] Furthermore, it was known that a cell-adhesion operation of a fibronectin etc. will be checked under coexistence of ethylenediaminetetraacetic acid. However, rapid intravenous administration of the disodium edetate which is ethylenediaminetetraacetic acid or its sodium salt had risk of causing low calcium nature tetany, convulsions, etc. Moreover, it was thought that potential toxicity was difficult for carrying out prolonged administration of these medicines on a problem.

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The purpose of this invention is to offer the cancer transition inhibitor which becomes considering an amino acid derivative and it with high cancer transition suppression activity, cell-adhesion prevention activity, and cell-migration prevention activity as an active principle, a cell-adhesion inhibitor, and a cell-migration inhibitor.

[Means for Solving the Problem] As a result of this invention persons' looking for an amino acid derivative to the above-mentioned technical problem, as compared with conventional Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), a new amino acid derivative with very high cancer transition depressor effect is found out, and it came to complete this invention.

[0008] That is, this invention offers the cancer transition inhibitor which contains the amino acid derivative shown by the 1 following general formula (I) or its salt permitted in pharmacology and the amino acid derivative shown by two general formulas (I), or its salt permitted in pharmacology as an active principle.

[Formula 2]



[http://www4.ipdl.jpo.go.jp/cgi-bin/tran\\_web/cgi\\_eje](http://www4.ipdl.jpo.go.jp/cgi-bin/tran_web/cgi_eje)

CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, and -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>- are mentioned. Especially desirable X is -CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, and -CH=CH-. It is also desirable that X does not exist. V and W show -COOH or -CONH<sub>2</sub>. even if V and W are mutually the same, they may differ. Desirable V and W are -COOH(s). P1 and P2 show an amino acid residue or a peptide residue. even if P1 and P2 are mutually the same, they may differ from each other, and even if they exist, it is not necessary to carry out them. As a desirable example of P1 and P2 which are an amino acid residue, an aspartic-acid residue and a glutamic-acid residue are mentioned. Moreover, when P1 and P2 are peptide residues, it is desirable that an aspartic-acid residue and a glutamic-acid residue are included during the array. R1 and R2 show a hydroxyl group or an organic machine. even if R1 and R2 are mutually the same, they may differ from each other, and they show a hydroxyl group preferably. When R1 and R2 are organic machines, a methylamino machine, t-butylamino machine, a benzylamino machine, and a heterocycle are desirable. Moreover, when R1 is an organic machine, P1 exists and it is desirable that the P1 is an aspartic-acid residue or a glutamic-acid residue. Similarly, when R2 is an organic machine, P2 exists and it is desirable that the P2 is an aspartic-acid residue or a glutamic-acid residue. R3 and R4 show a hydrogen atom or an alkyl group. even if R3 and R4 are mutually the same, they may differ from each other, and they show a hydrogen atom preferably. About the configuration of the asymmetric carbon atom which exists in a formula, any of R, S, and RS are respectively sufficient. Moreover, a hydrochloride, acetate, a sulfate, a lactate, etc. are mentioned as a desirable salt.

[0009] Furthermore, the cancer transition inhibitor which contains the compound and it which come to connect two or more amino acid derivatives shown by the general formula (I) or its salts which are permitted in pharmacology with the organic molecule which is macromolecule support or fixed molecular weight according to covalent bond through a connection machine as an active principle is also included by the range of this invention. As an organic molecule used as the amino acid derivative shown by the general formula (I) in such a compound, or its support of a salt permitted in pharmacology, a phthalic acid, a trimesic acid, a tetrahydrofuran tetrapod carboxylic acid, a polymethacrylic acid, a carboxymethyl chitin, a sulfation carboxyl methyl chitin, the poly lysine, chitosan, etc. are mentioned. Ethylenediamine, a lysine, etc. are mentioned as a connection machine. As a linkage method to support, the method of connecting the carboxyl group of the amino acid derivative shown by the general formula (I) through ethylenediamine, a lysine, etc. as a connection machine and support by amide combination is mentioned, for example. Moreover, you may connect by amide combination through a beta alanine etc. as an amino-groups [ , such as the poly lysine and chitosan, ], direct, or connection machine. However, the macromolecule support of this invention, an organic molecule with fixed molecular weight, and a connection machine are not restricted to these.

[0010] In view of the action mechanism which shows high cancer transition depressor effect and the cell-migration prevention effect as shown in a postscript, and shows such an effect, it is clear that the compound's of this invention the cell-adhesion prevention effect is also shown. Hereafter, although composition of the compound of this invention etc. is explained further, this invention is not limited to these. In addition, in the following explanation and an example, it may express as the cable address based on International Union of Pure and Applied Chemistry-IUB commission on Biological Nomenclature, and the common use cable address in the field concerned about amino acid, a protective group, an active group, etc.

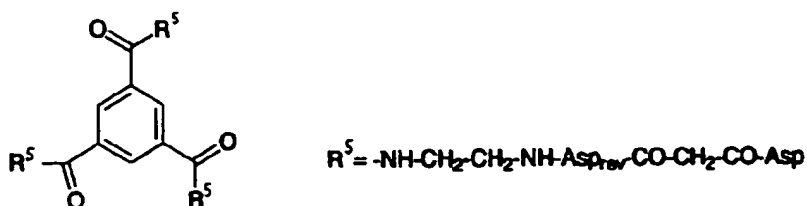
[0011] The compound of this invention is condensed with the aspartic acid and glutamic acid from which the 2Eq side chain and the carboxyl group were protected by the suitable basis, an asparagine, glutamines or these corresponding derivatives, and a 1Eq corresponding dicarboxylic acid, next is compoundable by performing desalting and salt formation through a deprotection and refining.

[0012] The DCC method, the DCC-additive method, the CDI method, the DPPA method, etc. can be used for condensation with the corresponding protection amino acid in this method, or a protection amino acid derivative and a corresponding dicarboxylic acid. Moreover, after reacting and using one [ a dicarboxylic acid or a dicarboxylic-acid anhydride, and ] protection amino acid derivative or peptide protector as a half-amide object, the compound of this invention makes the protection amino acid derivative or peptide protector of another side condense, and can also be compounded. When using a dicarboxylic acid, it is desirable to use a 2 to 10Eq dicarboxylic acid to one protection amino acid derivative or peptide protector. Furthermore, corresponding dicarboxylic-acid dihalide and a corresponding amino acid derivative may be made to react, and you may compound.

[0013] About a deprotection, it is greatly dependent on the used protective group. When a benzyl system protective group was used, the contact hydrogenolysis using Pd and Pt system catalyst gave the good result especially. Moreover, it is also desirable to use the trifluoroacetic-acid solution of a trifluoromethane sulfonic-acid-thio anisole system, a 1M-trifluoromethane sulfonic acid, a thio anisole, and m-cresol. However, still more various means are possible by the used protective group. As a purification method of the compound of the obtained this invention, the purification method of general peptides, such as the recrystallizing method, a gel-filtration method, a column chromatography, thin-layer chromatography, and liquid chromatography, is adopted. Especially the method using ion exchange resin about desalting and salt formation is easy. Moreover, HPLC or a medium pressure liquid chromatography can refine with desalting and salt formation. Moreover, what is necessary is just to use the protection amino acid and protection amino acid derivative which have the configuration which carries out considerable, respectively, when controlling the configuration of each existing asymmetrical carbon.

[0014] Although the desirable example of the compound of this invention is shown especially below, this invention is not limited to these.

Compound 1 The Asprev-CO-CO-Asp compound 2 The Asprev-CO-CH<sub>2</sub>-CO-Asp compound 3 Asprev-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-Asp compound 4 Asprev-CO-CH=CH-CO-Asp compound 5 Asprev-CO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CO-Asp compound 6 The Asnrev-CO-CH<sub>2</sub>-CO-Asn compound 7 The CH<sub>3</sub> NH-Asprev-CO-CH<sub>2</sub>-CO-Asp compound 8 Asprev-Asprev-CO-CH<sub>2</sub>-CO-Asp-Asp compound 9 Glurev-Asprev-CO-CH<sub>2</sub>-CO-Asp-Glu compound 10 Pherev-Asprev-Asprev-CO-CH<sub>2</sub>-CO-Asp-Asp-Phe compound 11. [Formula 3]



compound 12  $CH_3-NH-Asprev-Asprev-CO-CH_2-CO-Asp-Asp-NH-CH_3$  -- it is shown among compound 13  $C(CH_3)_3-NH-Asprev-Asprev-CO-CH_2-CO-Asp-Asp-NH-C(CH_3)_3$  formula that the amino acid residue has connected "rev" in the reverse array -  $CO-CH=CH-CO$  - Maleic-acid residue and  $-CO-C_6H_4-CO-$  shows a phthalic-acid residue.

[0015] Although the example of the compound of this invention is shown below, this invention is not limited to these.

[0016]

[Example]

Example 1 "Synthetic example of a compound 1"

Aspartic-acid dibenzyl esthetic RUPARA toluenesulfonic acid salt It is a dichloromethane about 50g (0.10 mols). It dissolves in 150ml and is a triethylamine. 31g (0.31 mols) was added and agitated. It is oxalyl chloride under ice-cooling. 30ml of 6.5g (0.051 mols) dichloromethane solutions was dropped. After making it react for 1 hour, reaction mixture was washed with water and the organic layer was dried with magnesium sulfate. The solvent was distilled off under reduced pressure, the silica gel chromatography (eluate : dichloromethane) refined the residue, and 11g of protectors was obtained. A protector is dissolved in a methanol, an acetic acid, and 300ml (40:10:5) of water, and it is palladium carbon. 2g was added and hydrogenolysis was performed at the room temperature for 6 hours. Cerite filtration of the reaction mixture was carried out, and reduced pressure distilling off of the solvent was carried out. Cold water washes the obtained crystal and it is a compound 1. 2.0g was obtained.

FAB Mass : 321(M+H+)

$^1H-NMR(D_2O, \delta)$  N, 8.75 Found : H, 3.72; C, 37.51; N, 8.75. : 2.58-2.80 (4H, m), 4.00-4.50 CHN Anal (2H, m) : Calcd.: H, 3.78; C, 37.51; [0017] Example 2 "the synthetic example of a compound 2"

Aspartic-acid dibenzyl esthetic RUPARA toluenesulfonic acid salt 48.6g (0.10 mols), malonic acid It is a dichloromethane about 5.15g (0.05 mols). It dissolves in 200ml and is a triethylamine. 10.1g (0.11 mols) was dropped. Reaction mixture is cooled at -5 times, and it is a dicyclohexylcarbodiimide. 21.7g dichloromethane solution After adding 50ml and agitating for 1 hour, it agitated at the room temperature for 3 hours. After adding ethyl acetate to reaction mixture and washing in citric-acid solution 5%, the organic layer was dried with magnesium sulfate. A solvent is distilled off under reduced pressure, the residue is recrystallized with ethyl acetate, and it is a protector. 20g was obtained. A protector is dissolved in a methanol, an acetic acid, and 500ml (40:10:5) of water, and it is palladium carbon. 2g was added and hydrogenolysis was performed at the room temperature for 6 hours. Cerite filtration of the reaction mixture is carried out, reduced pressure distilling off of the solvent is carried out, and it is a compound 2. 7.0g was obtained.

FAB Mass : 335(M+H+)

$^1H-NMR(D_2O, \delta)$  ; N, 7.95 Found : H, 4.41; C, 37.71; N, 7.96. : 2.98 (4H, d), 3.40 (2H, S), 4.81 CHN Anal (2H, t) : Calcd.: H, 4.58; C, 37.50 [0018] Example 3 "Composition of a compound 3"

It compounded like the example 2 using the succinic acid.

FAB Mass : 349(M+H+)

$^1H-NMR(D_2O, \delta)$  : 2.58 (4H, s), 2.96 (4H, d), and 4.81 (2H, t) [0019] Example 4 "Composition of a compound 4"

It compounded like the example 2 using the maleic acid.

FAB Mass : 347(M+H+)

$^1H-NMR(D_2O, \delta)$  : 2.96 (4H, d), 4.81 (2H, t), 6.38 (2H, d) [0020] Example 5 "Composition of a compound 5"

It compounded like the example 2 using the phthalic acid.

FAB Mass : 397(M+H+)

$^1H-NMR(D_2O, \delta)$  : 2.96 (2H, d), 4.81 (2H, t), 7.65 (4H, s) examples 6 "Composition of a compound 6"

It compounded like the example 2 using the Asn-OBzl hydrochloride.

FAB Mass : 333 (M+H+) examples 7 "Composition of a compound 7"

4.9g (0.01 mols) of aspartic-acid dibenzyl esthetic RUPARA toluenesulfonic acid salts, 5.15g (0.05 mols) of malonic acids It dissolves in a dichloromethane and is dicyclohexylcarbodiimide 2.17g (0.11 mols). In addition, it stirred at the room temperature. Insoluble matter was carried out the \*\* exception, reaction mixture was washed in citric-acid solution and saturation sodium-hydrogencarbonate solution 10%, and it dried by anhydrous sodium sulfate. After distilling off a solvent under reduced pressure, it dissolves in a dichloromethane again, and they are dicyclohexylcarbodiimide 2.17g (0.11 mols) and aspartic-acid beta-benzyl ester methyl amide 2.7 g (0.01 mols). In addition, it stirred at the room temperature. Insoluble matter was carried out the \*\* exception, reaction mixture was washed in citric-acid solution and saturation sodium-hydrogencarbonate solution 10%, and it dried by anhydrous sodium sulfate. Under reduced pressure, the solvent was distilled off, the silica gel chromatography refined the residue (an eluate, ethyl acetate), and protector 4.3 g was obtained. The obtained protector was dissolved in a methanol, an acetic acid, and 50ml (40:10:5) of water, palladium carbon 0.5 g was added, and hydrogenolysis was performed at the room temperature for 6 hours. \*\* light filtration of the reaction mixture was carried out, reduced pressure distilling off of the solvent was carried

out, and 1.2 g was obtained for the compound 7.

FAB Mass: 348 (M+H<sup>+</sup>) examples 8 "Composition of a compound 8"

It compounded like the example 2 using the Asp(OBzl)-Asp(OBzl)-OBzl hydrochloride.

FAB Mass : 565 (M+H<sup>+</sup>) examples 9 "Composition of a compound 9"

It compounded like the example 2 using Asp(OBzl)-Glu(OBzl)-OBzl.

FAB Mass : 593 (M+H<sup>+</sup>) examples 10 "Composition of a compound 10"

Asp(OBzl)-Asp(OBzl)-Phe It used and compounded like the example 2.

FAB Mass : 859(M+H<sup>+</sup> [0021] Example 11 "B16-BL6 melanoma cell experimental lung-metastasis examination"

The cancer transition depressant action of the compounds of this invention was examined. The examined substance and the B16-BL6 melanoma cell which is very a strong cancer cell of transition nature were given after mixture, and the intravenous injection of the 0.2 ml was respectively given to the female mouse of C57BL/6 of one groups [ five ] in PBS. In mixture 0.2 ml with which it was injected, 5x10<sup>4</sup> B16-BL6 cells were contained. 14 days after medication, the lung colony count of a mouse was counted and it compared with the PBS medication group of contrast. A result is shown in the following tables. In addition, EDTA and an EDTA diamide with fibronectin partial peptide Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) by which cancer transition depressor effect is known as a comparison sample or a Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) peptide, and a chelate effect were used.

[Table 1]

Table [ ] 1 ----- Subject sample Dose Transition lung colony count (mug / mouse) an average of -- \*\*SD (range)

```

***** . ***** . The ***** method . *****
***** . ***** machine double ***** . *****
***** . ***** . Horizontal ***** . *****
***** . ***** . ***** . ***** . *****
***** < ***** I ***** < ***** I *****

```

Table [ ] 2 ----- Subject sample Dose Transition lung colony count (mug / mouse) an average of -- \*\*SD (range)

```

***** . ***** . The ***** method . *****
***** . The ***** method ***** . *****
***** . ***** . ***** . ***** . *****
***** I ***** < ***** I ***** < *****

```

Table [ ] 3 ----- Subject sample Dose Transition lung colony count (mug / mouse) an average of -- \*\*SD (range)

```

***** . ***** . The ***** method . *****
***** . The ***** method ***** Take the initiative . ***** . Horizontal
machine ***** . ***** rice porridge . ***** . Horizontal *****
***** . ***** machine . ***** . The *****
method ***** . ***** . ***** I ***** < ***** . ***** I ***** < *****

```

\*\*\*\* [0022] Example 12 "L5178 Y-ML25 T-lymphoma cell experimental lung-metastasis examination"

An examined substance and L5178 Y-ML25 They are after mixture and its 0.2ml in PBS respectively about T-lymphoma cell. The intravenous injection was given to CDF1 mouse of one groups [ five ]. In 0.2ml of mixture with which it was injected, it is L5178 Y-ML25. 4x10<sup>4</sup> T-lymphoma cells were contained. It compared with the PBS medication group of contrast of the weight of the liver of a mouse, and a spleen 14 days after medication. A result is shown in Table 4. In addition, the fibronectin partial peptide Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) peptide by which cancer transition depressor effect is known as a comparison sample was used.

[Table 4]

```

Table 4----- "***** (***** (***** ..)) -- ***** --
** beam - **** -- infinityB- **** -- ***** epsilon empress method ***** Rice porridge I
***** I **** ** I horizontal machine **** I **** ***** . ** I ***** I
***** . ** I ***** I ***** . ***** Rice porridge I ***** I horizontal **
** I horizontal ***** I **** ***** mu ***** . ** I ***** I ****
**[*****]***** . ***** I ***** < ***** . ***** I ****

```

[0023] Example 13 "B16-BL6 melanoma cell experimental \*\*\*\* examination"

The coat of the reconstruction basement-membrane MATORI gel of 5microg was carried out to the upper front face of a transformer WERUSERU culture chamber, and the coat of the fibronectin of 5microg was carried out to the lower layer front face. The B16-BL6 melanoma cell of 2x10<sup>5</sup>/100microl / chamber was added to the chamber upper layer, and it cultivated under examined substance existence or nonexistence for 3 hours. The number of cells which moved to the filter lower front face was measured under the microscope, and it considered as the index of cell \*\*\*\*. A result is shown in Table 5.

[Table 5]

```

Table [ ] 5 ----- "***** (***** ..) O ***** ^ *****
The ***** method ***** . ***** . ***** . ***** . *****
***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . *****
***** < ***** . ***** I ***** < ***** I ***** [0024] The very high cancer transition depressor effect

```

of the compound of this invention and the cell-migration prevention effect are clear from the above result.

[0025] The thing [ that make a kind into a cancer transition inhibitor with the support or the assistant for physic of common use by the case, and the amino acid derivative of this invention and its salt permitted in pharmacology medicate a patient with it at least ] is possible. The dose is the range of 0.2 microg/kg - 600mg/kg per day (weight), and is determined based on a patient's symptom, age, weight, etc. As for the

compound of this invention, or its salt, it is desirable to prescribe a medicine for the patient by the medication method currently generally used for peptide system physic, i.e., the parenteral administration method, for example, intravenous administration, intramuscular administration, hypodermic administration, etc. When manufacturing such a tablet for injection, the compound of this invention or its salt is dissolved in PBS or a physiological saline, and it is good also as a tablet for injection, or after dissolving in about [ 0.1N ] acetic-acid water etc., it is good also as lyophilized products. In such a tablet, you may add stabilizers of common use, such as a glycine and albumin. Furthermore, the compound of this invention or its salt is possible also for the shape of the microcapsule agent tolerated for example, in the liposome, or a microsphere, a hydro gel, then carrying out internal use, and if it is made into forms, such as a suppository, a sublingual tablet, and rhinenchysis spray, it is possible [ a salt ] to also make it absorb also from mucosae other than an alimentary canal.

[0026]

[Effect of the Invention] The compound of this invention has very high cancer transition suppression activity [ the conventional cellular-adhesiveness peptide (RGDS, GRGDS) ]. Therefore, it has selectivity to the transition depressant action of a cancer cell, and is useful especially as a cancer transition inhibitor.

---

[Translation done.]

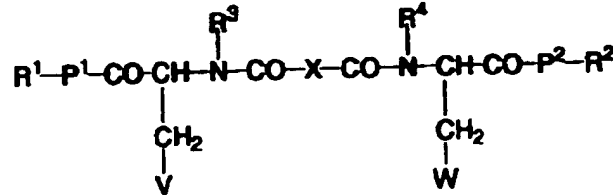


(11)特許出願公開番号

を示し、 $R^1$ 、 $R^2$ は水酸基または有機基を示し、 $R^3$ 、 $R^4$ は水素原子あるいはアルキル基を示す。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記、一般式 (I) で示されるアミノ酸誘導体、またはその薬理学的に許容される塩。一般式 \*



式中、Xは炭素数1～3の直鎖または分岐のアルキレン基、炭素数4～8の環状アルキレン基あるいはフェニレン基を示し、置換基、不飽和基を有していてもよい。Xは存在してもしなくてもよい。V、Wは-COOHあるいは-CONH<sub>2</sub>を示す。V、Wは互いに同じでも異なってもよい。P<sup>1</sup>、P<sup>2</sup>はアミノ酸残基あるいはペプチド残基を示す。P<sup>1</sup>、P<sup>2</sup>は互いに同じでも異なってもよく、存在してもしなくてもよい。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は水酸基または有機基を示す。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は互いに同じでも異なってもよい。R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>は水素原子あるいはアルキル基を示す。R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>は互いに同じでも異なってもよい。式中に存在する不斉炭素原子の立体配置に関しては、各々R、S、RSのいずれでもよい。

【請求項2】 R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>が水酸基であり、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>が水素原子である請求項1記載の化合物。

【請求項3】 一般式 (I) で示されるアミノ酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を共有結合により高分子あるいは有機分子に複数個連結してなる化合物。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の化合物を含有してなる癌転移抑制剤。

【請求項5】 請求項1～3のいずれかに記載の化合物を含有してなる細胞接着阻害剤。

【請求項6】 請求項1～3のいずれかに記載の化合物を含有してなる細胞移動阻害剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、高い癌転移抑制効果、細胞接着阻害活性、および細胞移動阻害活性を示すアミノ酸誘導体に関する。

## 【0002】

【従来の技術】フィブロネクチンやビトロネクチンは細胞と細胞外基質の接着に関与する細胞外マトリックス分子と呼ばれるタンパク質である。最近、これらの相互作用は一連の細胞表面のレセプターにより仲介されていることが明らかとなった。そして、フィブロネクチンの細胞結合ドメイン中のArg-Gly-Asp配列が認識部位であることが明らかにされ（ネイチャー(Nature)、第309巻、30頁、1984年）、その細胞受容体の一つがインテグリンファミリーに属するVLA-5レセプターであることが報告されている。さらに、Arg-Gly-Asp配列はビトロネクチン等の他の接着性蛋白質にも存在していることが知

## \* (I)

## 【化1】

10※られている。また、細胞外マトリックス分子は上記配列を介して、被接着細胞のレセプターと接合し、その情報を接着細胞に伝達するといわれている。さらに、ヘパリン、コラーゲン、フィブリン等の生体高分子との結合能も有し、細胞と間質結合組織との接着、細胞の分化、増殖に関与しているとも考えられている。

【0003】一方、これらの細胞外マトリックス分子は癌の転移過程において癌細胞の接着、遊離の制御にも関与していると予想されている。そこで、認識部位であるArg-Gly-Asp配列を持つペプチドを用いて癌細胞の転移を阻害する試みが報告されている。例えばYamadaらは、フィブロネクチンの接着シグナルであるペンタペプチド(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser)が転移性癌細胞であるB16-F10メラノーマ細胞の肺への実験的転移を抑制することを示した(サイエンス(Science)、第233巻、467頁、1986年)。さらに、この配列を有するオリゴペプチドあるいはその繰り返し構造を有するポリペプチドを用いて、より効率的に癌転移を抑制する方法が開示されている(インターナショナル ジャーナル オブ バイオリジカルマクロモレキュلز(Int. J. Biol. Macromol. 1.)、第11巻、23頁、1989年、同誌、第11巻、226頁、1989年、ジャパン ジャーナル オブ キャンサー リサーチ(Jpn. J. Cancer Res.) 第60巻、722頁、1989年、特開平2-174798号)。

【0004】しかしながら、Arg-Gly-Asp配列を持つこれらのオリゴペプチドの活性は十分ではなく解決すべき課題として残されていた。

【0005】さらに、エチレンジアミン四酢酸の共存下においてフィブロネクチン等の細胞接着作用が阻害されることが知られていた。しかしながら、エチレンジアミン四酢酸あるいはそのナトリウム塩であるエデト酸二ナトリウムの急速な静脈内投与は低カルシウム性テタニー、痙攣等を起こす危険があった。また、これらの薬剤を長期投与することは潜在毒性が問題で困難と考えられていた。

## 【0006】

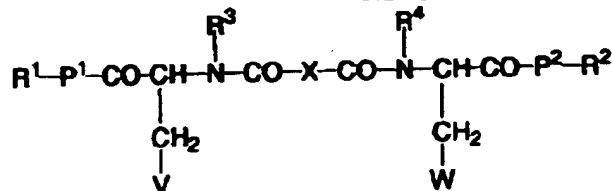
【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、高い癌転移抑制活性、細胞接着阻害活性、および細胞移動阻害活性を持つアミノ酸誘導体およびそれを有効成分としてなる癌転移抑制剤、細胞接着阻害剤、および細胞移動阻害剤を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記課題に対して、本発明者らはアミノ酸誘導体の探索を行なった結果、従来の Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) と比較して、非常に高い癌転移抑制効果を持つ新規アミノ酸誘導体を見出し本発明を完成するに至った。

\*【0008】即ち本発明は、1) 下記一般式 (I) で示されるアミノ酸誘導体、またはその薬理的に許容される塩および、2) 一般式 (I) で示されるアミノ酸誘導体またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する癌転移抑制剤を提供する。一般式 (I)

【化2】



式中、Xは炭素数1から3の直鎖または分岐のアルキレン基、炭素数4～8の環状アルキレン基あるいはフェニレン基を示し、置換基、不飽和基を有していてもよい。Xは存在してしなくてもよい。好ましいXとしては、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4-$ が挙げられる。特に好ましいXは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ である。Xが存在しないことも好ましい。V、Wは $-\text{COOH}$ あるいは $-\text{CONH}_2$ を示す。V、Wは互いに同じでも異なってもよい。好ましいV、Wは $-\text{COOH}$ である。P<sup>1</sup>、P<sup>2</sup>はアミノ酸残基あるいはペプチド残基を示す。P<sup>1</sup>、P<sup>2</sup>は互いに同じでも異なってもよく、存在してしなくてもよい。アミノ酸残基であるP<sup>1</sup>、P<sup>2</sup>の好ましい例としてはアスパラギン酸残基、グルタミン酸残基が挙げられる。また、P<sup>1</sup>、P<sup>2</sup>がペプチド残基である場合、その配列中にアスパラギン酸残基、グルタミン酸残基を含むことが好ましい。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は水酸基あるいは有機基を示す。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は互いに同じでも異なってもよく、好ましくは水酸基を示す。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>が有機基の場合はメチルアミノ基、トブチルアミノ基、ベンジルアミノ基、およびヘテロ環が好ましい。また、R<sup>1</sup>が有機基である場合、P<sup>1</sup>が存在し、そのP<sup>1</sup>がアスパラギン酸残基あるいはグルタミン酸残基であることが好ましい。同様に、R<sup>2</sup>が有機基である場合、P<sup>2</sup>が存在し、そのP<sup>2</sup>がアスパラギン酸残基あるいはグルタミン酸残基であることが好ましい。R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>は水素原子あるいはアルキル基を示す。R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>は互いに同じでも異なってもよく、好ましくは水素原子を示す。式中に存在する不斉炭素原子の立体配置に関しては、各々R、S、RSのいずれでもよい。また、好ましい塩としては、塩酸塩、酢酸塩、硫酸塩、乳酸塩などが挙げられる。

【0009】さらに、一般式 (I) で示されるアミノ酸誘導体またはその薬理的に許容される塩を連結基を介して共有結合により高分子担体あるいは一定分子量である有機分子に複数個連結してなる化合物及びそれを有効成分として含有する癌転移抑制剤も本発明の範囲に包含される。このような化合物において一般式 (I) で示さ

※れるアミノ酸誘導体またはその薬理的に許容される塩の担体となる有機分子としては、フタル酸、トリメシン酸、テトラヒドロフランテトラカルボン酸、ポリメタクリル酸、カルボキシメチルキチン、硫酸化カルボキシメチルキチン、ポリリジン、キトサン等が挙げられる。連結基としてはエチレンジアミン、リジン等が挙げられる。担体への連結法としては、例えば、連結基としてエチレンジアミン、リジン等を介して一般式 (I) で示されるアミノ酸誘導体と担体のカルボキシル基をアミド結合で連結する方法が挙げられる。また、ポリリジン、キトサンなどのアミノ基と直接、あるいは連結基としてβアラニン等を介してアミド結合で連結してもよい。ただし、本発明の高分子担体、一定分子量を持つ有機分子、および連結基はこれらに限られるものではない。

【0010】本発明の化合物は後記に示すように高い癌転移抑制効果、細胞移動阻害効果を示し、またこのような効果を示す作用機序からみて、細胞接着阻害効果をも示すことは明らかである。以下、本発明の化合物の合成等についてさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、以下の説明および実施例においてアミノ酸、保護基、活性基などについてIUPAC-IUB commission on Biological Nomenclatureに基づく略号および当該分野における慣用略号で表示する場合がある。

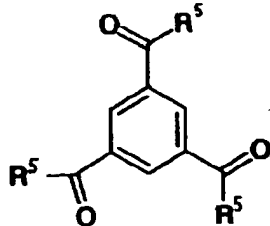
【0011】本発明の化合物は、例えば二当量の側鎖およびカルボキシル基が適当な基で保護されたアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、あるいはこれらの相当する誘導体と一当量の相当するジカルボン酸と縮合し、次に、脱保護および精製を経て脱塩および塩形成を行ない合成することができる。

【0012】本方法における、相当する保護アミノ酸、あるいは保護アミノ酸誘導体と相当するジカルボン酸との縮合には、DCC法、DCC-additive法、CDI法、DPPA法等を使用することができる。また本発明の化合物は、ジカルボン酸またはジカルボン酸無水物と一方の保護アミノ酸誘導体あるいはペプチド保護体を反応して半アミド体とした後に、他方の保護アミノ酸誘導体あるいはペプチド保護体を縮合させて合成する

5

こともできる。ジカルボン酸を用いる場合、一方の保護アミノ酸誘導体あるいはペプチド保護体に対して2当量から10当量のジカルボン酸を用いるのが好ましい。さらに、相当するジカルボン酸ジハライドと相当するアミノ酸誘導体を反応させて合成してもよい。

【0013】脱保護に関しては、用いた保護基に大きく依存する。ベンジル系保護基を用いた場合、Pd、Pt系触媒を用いた接触加水素分解が特によい結果を与えた。また、トリフルオロメタンスルホン酸-チオアニソール系、1M-トリフルオロメタンスルホン酸、チオアニソール、m-クレゾールのトリフルオロ酢酸溶液を用いることも好ましい。しかし、用いた保護基によりさらに多様な手段が可能である。得られた本発明の化合物の精製法として、再結晶法、ゲルろ過法、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー等、一般的なペプチドの精製法が採用される。脱塩、塩形成に関しては、イオン交換樹脂を用いる方法が特に容易である。また、HPLCあるいは中圧液体クロマトグラフィーにより脱塩、塩形成とともに精製を行うことができる。また、存在する各々の不斉炭素の立体\*20



化合物12  $CH_3-NH-Asp^{rev}-Asp^{rev}-CO-CH_2-CO-Asp-Asp-NH-CH_3$

化合物13  $C(CH_3)_3-NH-Asp^{rev}-Asp^{rev}-CO-CH_2-CO-Asp-Asp-NH-C(CH_3)_3$

式中、"rev"はアミノ酸残基が逆配列で連結していることを示す。 $-CO-CH=CH-CO-$ はマレイン酸残基、 $-CO-C_6H_4-CO-$ はフタル酸残基を示す。

【0015】以下に本発明の化合物の実施例を示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0016】

【実施例】

実施例1 「化合物1の合成例」

アスパラギン酸ジベンジルエステルバタトルエンシルホン酸塩 50g (0.10mol)をジクロロメタン 150mlに溶解し、トリエチルアミン 31g (0.31mol)を加え攪拌した。氷冷下にてオキサリルクロライド 6.5g (0.051mol)のジクロロメタン溶液30mlを滴下した。一時間反応させた後、反応液を水で洗い、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下にて溶媒を留去し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(溶離液:ジクロロメタン)にて精製し保護体11gを得た。保護体をメタノール、酢酸、水(40:10:5)300mlに溶解し、パラジウムカーボン 2gを加え室温にて6時間加水素分解を行なつ※50

6

\*配置を制御する場合はそれぞれ相当する立体配置を有する保護アミノ酸および保護アミノ酸誘導体を用いればよい。

【0014】以下に本発明の化合物の特に好ましい具体例を示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

化合物1  $Asp^{rev}-CO-CO-Asp$

化合物2  $Asp^{rev}-CO-CH_2-CO-Asp$

化合物3  $Asp^{rev}-CO-CH_2-CH_2-CO-Asp$

10 化合物4  $Asp^{rev}-CO-CH=CH-CO-Asp$

化合物5  $Asp^{rev}-CO-C_6H_4-CO-Asp$

化合物6  $Asn^{rev}-CO-CH_2-CO-Asn$

化合物7  $CH_3NH-Asp^{rev}-CO-CH_2-CO-Asp$

化合物8  $Asp^{rev}-Asp^{rev}-CO-CH_2-CO-Asp-Asp$

化合物9  $Glu^{rev}-Asp^{rev}-CO-CH_2-CO-Asp-Glu$

化合物10  $Phc^{rev}-Asp^{rev}-Asp^{rev}-CO-CH_2-CO-Asp-Asp-Phc$

化合物11

【化3】

※た。反応液をセライトろ過し、溶媒を減圧留去した。得られた結晶を冷水にて洗浄し、化合物1 2.0gを得た。

30 FAB Mass : 321 (M+H<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O, δ) : 2.58-2.80 (4H, m), 4.00-4.50 (2H, m)

CHN Anal : Calcd. : H, 3.78; C, 37.51; N, 8.75

Found : H, 3.72; C, 37.51; N, 8.75

【0017】実施例2「化合物2の合成例」

アスパラギン酸ジベンジルエステルバタトルエンシルホン酸塩 48.6g (0.10mol)、マロン酸 5.15g (0.05mol)をジクロロメタン 200mlに溶解し、トリエチルアミン 10.1g (0.11mol)を滴下した。反応液を-5度に冷却し、ジシクロヘキシルカルボジイミド 21.7gのジクロロメタン溶液 50mlを加えて一時間攪拌した後、室温で三時間攪拌した。反応液に酢酸エチルを加え、5%クエン酸水溶液で洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下にて溶媒を留去し、残留物を酢酸エチルで再結晶して保護体 20gを得た。保護体をメタノール、酢酸、水(40:10:5)500mlに溶解し、パラジウムカーボン 2gを加え室温にて6時間加水素分解を行なった。反応液をセライトろ過し、溶媒を減圧留去し、化合物2 7.0gを得た。

40 FAB Mass : 335 (M+H<sup>+</sup>)

7

$^1\text{H-NMR}$  (D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ): 2.98 (4H, d), 3.40 (2H, s), 4.81 (2H, t)

CHN Anal: Calcd.: H, 4.58; C, 37.50; N, 7.95

Found: H, 4.41; C, 37.71; N, 7.96

【0018】実施例3 「化合物3の合成」

コハク酸を用いて実施例2と同様に合成した。

FAB Mass: 349 (M+H<sup>+</sup>)

$^1\text{H-NMR}$  (D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ): 2.58 (4H, s), 2.96 (4H, d), 4.81 (2H, t)

【0019】実施例4 「化合物4の合成」

マレイン酸を用いて実施例2と同様に合成した。

FAB Mass: 347 (M+H<sup>+</sup>)

$^1\text{H-NMR}$  (D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ): 2.96 (4H, d), 4.81 (2H, t), 6.38 (2H, d)

【0020】実施例5 「化合物5の合成」

フタル酸を用いて実施例2と同様に合成した。

FAB Mass: 397 (M+H<sup>+</sup>)

$^1\text{H-NMR}$  (D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ): 2.96 (2H, d), 4.81 (2H, t), 7.65 (4H, s)

実施例6 「化合物6の合成」

Asn-OBzl 塩酸塩を用いて実施例2と同様に合成した。

FAB Mass: 333 (M+H<sup>+</sup>)

実施例7 「化合物7の合成」

アスパラギン酸ジベンジルエステルバタトルエンスルホン酸塩4.9 g (0.01mol)、マロン酸5.15 g (0.05mol) をジクロロメタンに溶解し、ジシクロヘキシルカルボジイミド2.17 g (0.11mol) を加え室温で攪拌した。不溶物をろ別して反応液を10%クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下にて溶媒を留去した後、再びジクロロメタンに溶解し、ジシクロヘキシルカルボジイミド2.17 g (0.11mol)、アスパラギン酸 $\beta$ -ベンジルエステルメチルアミド2.7 g (0.01mol) を加え室温で攪拌した。不溶物をろ別して反応液を10%クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下にて溶媒を留去して残留物をシリカゲ\*

8

\*ルクロマトグラフィーにより精製し(溶離液、酢酸エチル)、保護体4.3 gを得た。得られた保護体をメタノール、酢酸、水(40:10:5) 50mlに溶解し、パラジウムカーボン0.5 gを加えて室温にて6時間加水素分解を行なった。反応液をセライトろ過し、溶媒を減圧留去して化合物7を1.2 gを得た。

FAB Mass: 348 (M+H<sup>+</sup>)

実施例8 「化合物8の合成」

Asp(Obzl)-Asp(Obzl)-Obzl 塩酸塩を用いて実施例2と同様に合成した。

FAB Mass: 565 (M+H<sup>+</sup>)

実施例9 「化合物9の合成」

Asp(Obzl)-Glu(Obzl)-Obzlを用いて実施例2と同様に合成した。

FAB Mass: 593 (M+H<sup>+</sup>)

実施例10 「化合物10の合成」

Asp(Obzl)-Asp(Obzl)-Phe.を用いて実施例2と同様に合成した。

FAB Mass: 859 (M+H<sup>+</sup>)

20 【0021】実施例11 「B16-BL6メラノーマ細胞実験的肺転移試験」

本発明の化合物類の癌転移抑制作用について検討した。被験物質と非常に転移性の強い癌細胞であるB16-BL6メラノーマ細胞を各々PBS中で混合後、その0.2 mlを1群5匹のC57BL/6の雌マウスに静脈注射した。注射された混合物0.2 ml中にはB16-BL6細胞が $5 \times 10^4$ 個含まれていた。投与14日後にマウスの肺コロニー数を数えて対照のPBS投与群と比較した。結果を以下の表に示す。

尚、比較試料として癌転移抑制効果が知られているフィブロネクチン部分ペプチドArg-Gly-Asp-Ser (RGDS)、またはGly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) ペプチド、およびキレート作用を持つEDTA、EDTAジアミドを用いた。

【表1】

表1

被験試料	投与量 ( $\mu\text{g}$ /マウス)	転移肺コロニー数 平均 $\pm$ SD (範囲)
PBS	----	101 $\pm$ 28 (61-133)
GRGDS	500	93 $\pm$ 45 (44-154)***
化合物1	500	16 $\pm$ 9 (7-32)***
化合物2	500	20 $\pm$ 7 (9-29)***
EDTA	500	死亡
EDTA diamide	500	死亡

t検定: \*\*\* P<0.001, \*\* P<0.01, \* P<0.02

【表2】

表2

被験試料	投与量 ( $\mu$ g/マウス)	転移肺コロニー数 平均 $\pm$ SD (範囲)
PBS	----	81 $\pm$ 23 (53-117)
RGDS	1000	89 $\pm$ 23 (55-122)
化合物2	500	30 $\pm$ 17 (18-62)***

t検定: \*\*\*P&lt;0.001、\*\* P&lt;0.01、\* P&lt;0.02

【表3】

10

表3

被験試料	投与量 ( $\mu$ g/マウス)	転移肺コロニー数 平均 $\pm$ SD (範囲)
PBS	----	139 $\pm$ 58 (62-219)
RGDS	1000	116 $\pm$ 43 (58-163)
化合物3	500	25 $\pm$ 10 (12-43)***
化合物4	500	20 $\pm$ 6 (10-28)***
化合物5	500	81 $\pm$ 40 (43-136)

t検定: \*\*\*P&lt;0.001、\*\* P&lt;0.01、\* P&lt;0.02

【0022】実施例12 「L5178Y-ML25  
T-リンパ腫細胞実験的肺転移試験」

被験物質とL5178Y-ML25 T-リンパ腫細胞を各々PBS中  
で混合後、その0.2mlを1群5匹のCDF1マウスに静脈  
注射した。注射された混合物0.2ml中にはL5178Y-ML2  
5 T-リンパ腫細胞が4 $\times$ 10<sup>4</sup>個含まれていた。投与\*

\*14日後にマウスの肝臓および脾臓の重量を対照のPBS  
投与群と比較した。結果を表4に示す。尚、比較試料と  
して癌転移抑制効果が知られているフィブロネクチン部  
分ペプチドArg-Gly-Asp-Ser (RGDS) ペプチドを用  
いた。

【表4】

表4

被験試料	投与量 ( $\mu$ g/マウス)	肝臓重量 平均 $\pm$ SD	脾臓重量 平均 $\pm$ SD
PBS	----	4.30 $\pm$ 0.93	0.25 $\pm$ 0.03
化合物2	1000	2.52 $\pm$ 1.03***	0.19 $\pm$ 0.05***
RGDS	1000	4.43 $\pm$ 0.21	0.26 $\pm$ 0.01
癌細胞未投与	----	1.05 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01

t検定: \*\*\* P&lt;0.001、\*\* P&lt;0.01

【0023】実施例13 「B16-BL6メラノーマ  
細胞実験的浸潤試験」

トランスウェルセルカルチャーチャンバーの上層表面に  
5 $\mu$ gの再構成基底膜マトリジェルをコートし、下層表  
面に5 $\mu$ gのフィブロネクチンをコートした。2 $\times$ 10<sup>5</sup>  
/100 $\mu$ l/チャンバーのB16-BL6メラノーマ ※

40※細胞をチャンバー上層に加え、被験物質存在下あるいは  
非存在下にて3時間培養した。フィルター下部表面に移  
動した細胞数を顕微鏡下で計測し、細胞浸潤の指標とし  
た。結果を表5に示す。

【表5】

表5

被験試料	試験濃度 ( $\mu$ g/ml)	移動細胞数 平均 $\pm$ SD
------	-----------------------	----------------------

11

12

PBS	----	45±2
RGDS	1000	45±4
化合物1	1000	9±3**
化合物2	1000	36±6

t検定: \*\*\*P&lt;0.001, \*\* P&lt;0.01, \* P&lt;0.02

【0024】以上の結果から、本発明の化合物の非常に高い癌転移抑制効果、細胞移動阻害効果は明らかである。

【0025】本発明のアミノ酸誘導体およびその薬理的に許容される塩は、その少なくとも一種を、場合により慣用の担体または医薬用助剤とともに、癌転移抑制剤として患者に投与することが可能である。その投与量は、一日あたり0.2μg/kg～600mg/kg（体重）の範囲で、患者の症状、年齢、体重等に基づいて決定される。本発明の化合物またはその塩は、ペプチド系医薬に一般に使用されている投与方法、即ち非経口投与方法、例えば静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与等によって投与するのが好ましい。そのような注射用製剤を製造する場合、本発明の化合物またはその塩を例えば、PBSまたは生理食塩水に溶解して、注射用製剤と\*

\*してもよく、あるいは0.1N程度の酢酸水等に溶解した後、凍結乾燥製剤としてもよい。このような製剤には、グリシンやアルブミン等の慣用の安定剤を添加してもよい。さらに、本発明の化合物またはその塩は、例えばリボソーム中に包容したマイクロカプセル剤あるいはミクロスフェア状、ハイドロゲル状とすれば経口投与することも可能であり、座剤、舌下錠、点鼻スプレー剤等の形にすれば消化管以外の粘膜からも吸収させることも可能である。

【0026】

【発明の効果】本発明の化合物は従来の細胞接着性ペプチド（RGDS、GRGDS）と比較して、かつ、非常に高い癌転移抑制活性を有している。したがって、癌細胞の転移抑制作用に対して選択性を持ち、癌転移抑制剤として特に有用である。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 C 233/56		7106-4H		
233/83		7106-4H		
237/22		7106-4H		
C 07 K 5/072		8318-4H		
5/093		8318-4H		

(72)発明者 稲葉 正  
神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真  
フィルム株式会社内

(72)発明者 済木 育夫  
北海道札幌市厚別区厚別北3条西5丁目12  
-6  
(72)発明者 東 市郎  
北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3-2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**